

# 原核細胞生物由来テルペン合成酵素の包括的解析

感染制御科学専攻 微生物創薬科学

DI 12005 山田 佑樹

## 【序論・目的】

テルペン化合物は menthol や limonene 等の香料成分や artemisinin や taxol といった医薬品に利用されており、植物や糸状菌の代表的な 2 次代謝産物として認識されてきた。一方、原核細胞生物が生産するテルペン化合物についての報告は、糸状菌や植物と比較して極めて乏しく、これまで稀な代謝産物として認識されてきた。原核細胞生物由来のテルペン化合物はこれまで geosmin (**1**), germacradienol (**2**), 2-methylisoborneol (**3**) および albaflavenone (**4**) 等といった揮発性の異臭物質が知られており、主に放線菌による代謝物として見出されている。

これまで、放線菌のほとんどは揮発性のテルペン化合物を生産するものと理解されていた。ゲノム解析が行なわれた *Streptomycetaceae* の菌株を固形培地で生育させ、菌体の *n*-hexane 抽出物を GC-MS で解析を行なった。その結果、*S. avermitilis* ATCC31267 や *S. albus* J1074 の他数種の菌株では上記の揮発性のテルペン化合物を生産する。一方で、*S. clavuligerus* ATCC 27064 や *S. lactacystinaeus* OM-6519 ではあらゆる培養方法によってもテルペン化合物を全く生産しないことが明らかになった。これらテルペン化

合物を生産しない菌株のゲノムからは geosmin synthase および 2-methylisoborneol synthase と推定される遺伝子が見出される。また、上記のテルペン化合物を生産する菌株のゲノムにおいても geosmin synthase、2-methylisoborneol synthase 以外に多数のテルペン合成酵素が見出される。このことは少なくとも *Streptomycetaceae* の放線菌では多くのテルペン合成酵素遺伝子が休眠状態であることが推定される。

これまでテルペン合成酵素およびその遺伝子による研究は、主として植物由来のもので行なわれてきた。これら生物種から多くのテルペン化合物が生成すること、さらに植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列は互いに相溶性が高いことから、BLAST 等の相溶性を利用した方法によって、テルペン合成酵素遺伝子を比較的容易にクローン化することが可能である。一方、

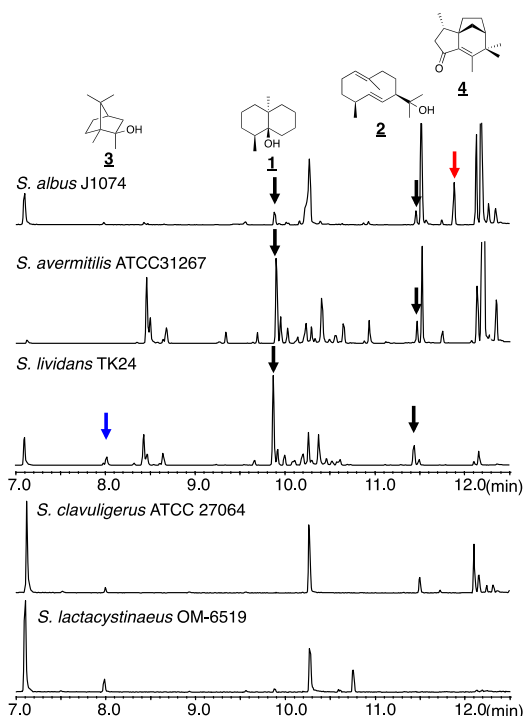


Fig. 1. GC-MS analysis of odoriferous terpenes in genome-sequenced *Streptomycetaceae* microorganisms.

細菌等の原核生物からテルペン合成酵素の単離は *S. exfoliatus* UC5319 の生産する sesquiterpene 抗生物質 pentalenolactone の母核構造 pentalenene を生成する pentalenene synthase が初めてであり、その後 21 世紀初頭に *Streptomyces* ゲノム解析が完了し、

geosmin/germacradienol synthase が明らかにされた。これら植物、糸状菌および放線菌のテルペン合成酵素のアミノ酸の 1 次配列には特徴的なモチーフが存在する。N 末端側から 80 ~ 120 アミノ酸残基(放線菌および糸状菌由来)あるいは 230 ~ 270 アミノ酸残基(植物由来)には酸性アミノ酸-rich 領域[(D/N)Dxx(D/E) or DDxxxE]と、さらに 140 アミノ酸残基程度 C 末側に NSE triad (NxxxSxxxE)

が配置している(PF03936; Terpene synthase family, metal binding domain)。植物由来のテルペン合成酵素では N 末端側に  $\alpha$ -barrel 構造に関与すると推定される 252 アミノ酸残基のモチーフ(PF01397; Terpene synthase, N-terminal domain)が存在する。植物由来のテルペン合成酵素で見出される、特徴的な後者のモチーフ(PF01397)は他の植物由来のテルペン合成酵素とアミノ酸配列に高い相同性が見出されるため、この領域を基に BLAST 検索で検出することが可能であると推察される。一方、糸状菌と細菌のテルペン合成酵素には植物のそれら

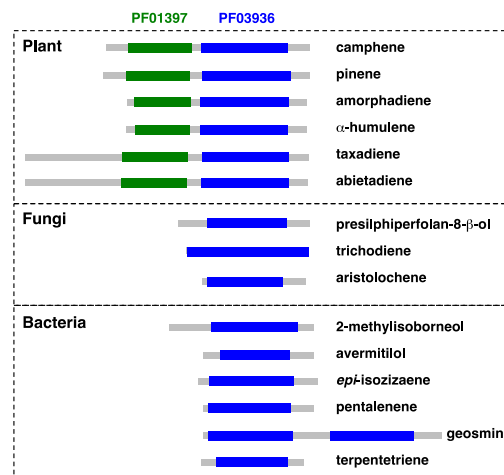


Fig. 2. Primary structures of terpene synthases

で見出される PF01397 のモチーフ配列は存在せず、PF03936 モチーフのみが存在する (Fig. 2)。さらに細菌のテルペン合成酵素ではこの領域のアミノ酸配列の相同性が互いに低いことが特徴的である。このことは、植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列を利用して、BLAST 解析による細菌のタンパク質データベースからのテルペン合成酵素の探索が極めて困難であったことの原因である。このようなことから、当研究室では 2008 年に PF03936 のモチーフ配列を使用して、相同性解析(BLAST 解析)ではなく、統計モデル(hidden Markov models; HMM)を使用したモチーフ解析を行ない、放線菌から 2-methylisoborneol synthase 遺伝子の存在を明らかにした<sup>1)</sup>。しかしながら、PF03936 は植物由来のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作製したモデルであるため、細菌全般からテルペン合成酵素の探索が可能であるか不明であった。そこで本研究は、原核細胞生物におけるテルペン合成酵素遺伝子の分布、ならびにそれらの遺伝子産物の機能および反応生成物の包括的な解析を目的として行った。

### 【方法】

2012 年に 2<sup>nd</sup>-HMM を用いて公的データベースの細菌タンパク質から 140 種のテルペン合成酵素と推定されるタンパク質を見出した<sup>2)</sup>。さらに 2014 年の公的データベースおよび当研究室で解析したゲノムデータから得た細菌のタンパク質(総数 8,759,463 タンパク質、5,152 菌種)を 2<sup>nd</sup>-HMM で得た 140 種のテルペン合成酵素のアミノ酸配列から新たに作製した 3<sup>rd</sup>-HMM を用いて検索したところ E-value  $5.3 \times 10^{-7} \sim 6.9 \times 10^{-207}$  で 262 個のテルペン合成酵素を推定することができた(2<sup>nd</sup>-HMM で上記の 8,759,463 のタンパク質から検索した場合、E-value は  $1.1 \times 10^{-1} \sim 2.9 \times 10^{-258}$ )。推定されたテルペン合成酵素の多くは *Actinomycetales* の菌群から見出されたが、これは公的データベースに、これらの菌種が多数登録されているものと推察される。一方、グラム陰性菌に属する *Myxococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, *Burkholderiales*, *Herpetosiphonales*, *Rhizobiales*,

*Chlamydiales*, *Flavobacteriales*, *Chromatiales*, *Ktedonobacterales*, *Sphingobacteriales* や *Pseudomonadales* から候補の合成酵素が見出されたことは興味深い。テルペン合成酵素と推定されるタンパク質が見出された菌群は、ほとんどが土壌微生物であった。推定された 262 のテルペン合成酵素のアミノ酸配列の alignment および、その結果の bootstrap 法による系統的解析から、これらの合成酵素は主に 3 つの分岐群が存在する

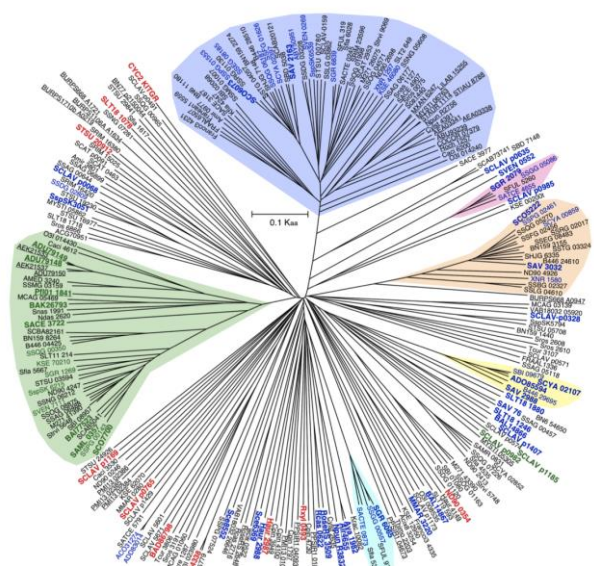


Fig. 3. Phylogenetic analysis of presumptive synthases from bacterial databases.□

(Fig. 3)。系統樹の上部には geosmin/germacradienol synthase の分岐群が、左側には 2-methylisoborneol/2-methylisobornane synthase の分岐群が、また右側の比較的小さな分岐群には *epi-isozizaene* synthase が見出された。

多くのテルペン合成酵素と推定されるタンパク質が見出されたが、それぞれの酵素によって生成する化合物情報は、それらの遺伝子が休眠状態であることから解析が不可能である。一般に大腸菌を用いた発現系で組換え酵素を

取得し反応解析を行なうが、*Actinomycetales* 由来のテルペン合成酵素の多くは大腸菌発現系で封入体を形成しやすく解析が困難な事例が多い。そこで、我々の研究室で開発された *S. avermitilis* SUKA 株を宿主とした異種遺伝子発現系を用いることにより、これらの合成酵素遺伝子の発現ならびに生産される化合物の解析を行った<sup>1), 3)</sup>。構成的強発現プロモーター(*rps.Jp*)の下流に各鎖長の polyprenyl diphosphate synthase 遺伝子を配置し、さらにその下流にテルペン合成酵素遺伝子を共発現するように連結した。系統樹の中で孤立した分岐群を形成しているものは新規な合成酵素であることが期待できるとともに新規な骨格を形成する反応を触媒することも期待できる。そこで、29 種の遺伝子を上記の *S. avermitilis* SUKA22 の発現系に供し、培養物の解析を行なった。

#### 【結果および考察】

異種発現系の培養で得た菌体へキサン抽出物を GC-MS 分析を行った結果、ほとんどの形質転換体でテルペン化合物を検出することができた。半数以上の生成物は、これまでに植物あるいは糸状菌から単離されたものであったが、細菌由来のテルペン合成酵素から初めて単離されたテルペン化合物が多く見出された。一方、新規骨格を有するテルペン化合物を 13 種見出すことができた。*S. clavuligerus* ATCC および *S. lactacystinaeus* OM-6519 由来の候補遺伝子 *sclav\_p1407* および *slt18\_1880* を上記の発現系を用いて *S. avermitilis* SUKA22 で発現させた結果、多量のセスキテルペン化合物の蓄積を検出した。菌体から methanol, *n*-hexane で抽出し、最終的にシリカゲルクロマトグラフィーでそれぞれ 1 種のセスキテルペン化合物を単離し、各種スペクトル解析によってその構造を推定した。その結果、それぞれ 5-5-5 員環を有する新規テルペン骨格を有する isohirsut-1-ene および isohirsut-4-ene と決定した。なお、細菌から triquinane



骨格を有する化合物の生成は初めての例である。

また *S. clavuligerus* ATCC 27064 由来の候補遺伝子 *sclav\_p0765* を発現させた形質転換株では、多量のジテルペン化合物の蓄積を観察した。上記と同様な方法で 4 種のジテルペン化合物を単離し、各種スペクトル解析によってその構造を推定した。これらのうち一つは sea plume から単離された isoelisabethatriene であった。残りの新規化合物 3 種のうち一つは新規な isoelisabethatriene の類似体であったが、他の 2 つのジテルペン化合物(hydropyrene(**5**)および hydropyrenol(**6**))は、これまで全く報告例の無い新規な骨格を有していた。なお(**5**)および(**6**)の生成過程は前駆体であるゲラニルゲラニル 2 リン酸の 2 リン酸基の引き抜きによってカルボカチオン **7** が生成、deprotonation を伴う閉環反応によって中間体 **8** を生成、さらに **8** から順次閉環反応が進行しカルボカチオン **9** を生成し、12 位の deprotonation によって(**5**)を生成し、また水分子によって捕捉されることにより(**6**)が生成する、と推定した(Fig. 4)。

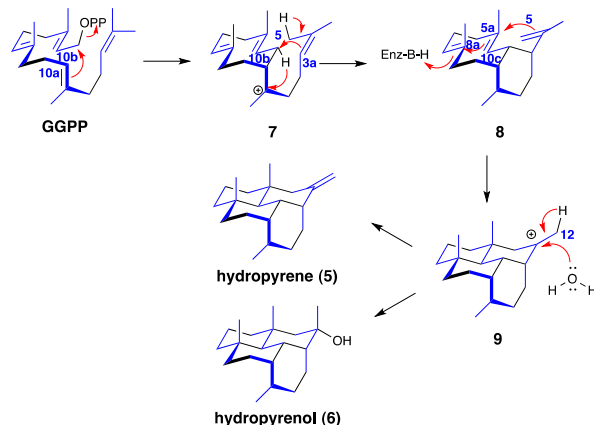


Fig. 4. Predicted cyclization of hydropyrene and hydropyrenol

この他に、*sclav\_p1169* 発現株からは clavulatriene A, B および prenyl- $\beta$ -elemene, prenylgermacrene B、*slt18\_1078* 発現株からは cyclooctat-7(8),10(14)-diene、*sts\_u\_20912* 発現株からは tsukubadiene、*nd90\_0354* 発現株では odyverdiene A, B の新規テルペン骨格を有するジテルペン化合物の生産が確認された(Fig. 5)。

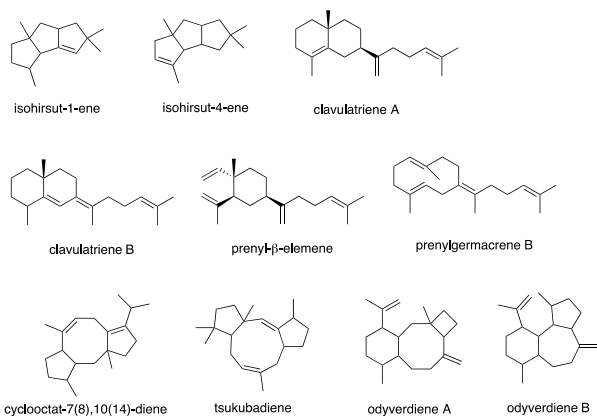


Fig. 5. The structure of newly identified sesquiterpenes and diterpenes produced by heterologous expression of genes encoding terpene synthases in *S. avermitilis* SUKA22.

以上の解析から細菌においてもテルペン合成酵素遺伝子が非常に多く存在していることが示され、異種発現系によって新規骨格を有するテルペン化合物を見出した。したがって細菌においても植物や糸状菌と同様に極めて多様なテルペン化合物が存在する事が示された。さらに HMM を用いたテルペン合成酵素の探索はこれまでにない新たな方法論として有用である。単に微生物を培養するだけでなく、新たなゲノム情報に対し本法を適

用することにより、新規な骨格を有するテルペン化合物を極めて効果的に探索できると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Komatsu, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 7422-7427.
- 2) Yamada, Y. *et al. Methods in Enzymology*, **2012**, Volume 515, pp. 123-166.
- 3) Komatsu, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 2646-2651.
- 4) Yamada, Y. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, 857-867.